云 南 植 物 研 究 1990; 12(4): 427—433
Acta Botanica Yunnanica

芒柄花素的放射免疫测定法

王伟群 韩正康 陈 杰

（南京农业大学动物生理生化教研室，南京210014）

摘要 本文建立了芒柄花素（formononetin）的放射免疫测定法（RIA）。该方法利用芒柄花素的衍生物作为同位素示踪物，获得的针对芒柄花素-7-O-羧甲基—牛血清白蛋白（BSA-F）的抗血清对芒柄花素具有高的亲和性（$Ka=6.8\times10^9$ L/M）。方法的检出限量为3.5±1.24 ng（n=13），检出范围为3.5—100 ng。用此方法测定红三叶草（*Trifolium pratense* L.）中的芒柄花素含量，批内、批间的平均误差分别为6.5%和11.9%，加样回收率平均为98.5%。红三叶草中芒柄花素含量为0.1305±0.495%（n=12）。南京地区夏季杂牧草饲料中芒柄花素含量为0.0062±0.030%（n=6）。并用此方法测定了饲喂红三叶草的湖羊血清中芒柄花素的血浓-时间曲线图。

关键词 芒柄花素；放射免疫测定法；红三叶草

RADIOIMMUNOASSAY FOR FORMONONETIN

Wang Weiqun, Han Zhengkang, Cheng Jie

(*Laboratory of Animal Physiology & Biochemistry, Nanjing Agricultural University*, Nanjing 210014)

Abstract A radioimmunoassay (RIA) that can be used for the quantification of formononetin is described. The assay utilizes antisera raised against a formononetin-7-O-(carboxymethyl) ether hapten. The tracer used was a (^{3}H)-derivative of formononetin that was stable at least for 2 months at 4℃. The detection limit of the assay is 3.5±1.24 ng (n=13) of formononetin, and the detection range of the assay is 3.5 ng to 100 ng of formononetin. Only formononetin is detected by the assay in the extracted red clover (*Trifolium pratense* L.). The reliability and reproducibility of the assay are demonstrated by intra-and inter-assay average variability of 6.5% and 11.9% cv, respectively. The recovery of the assay from the extracted red clover is about averagely 98.5%. The formononetin percentage in red clover is 0.1305±0.495% (n=12), and that in complex herbages of Nanjing district is 0.0062±0.030% (n=6). The formononetin content in the blood of Hu sheep was measured with this assay after feeding red clover.

Key words Formononetin; Radioimmunoassay; *Trifolium pratense*

1989-10-23收稿

* 国家教委基金资助课题。

豆科牧草中芒柄花素具有类似雌激素作用，曾导致一些地区牛、羊的繁殖率降低，国外已有报道，并认为对于反刍家畜，芒柄花素经瘤胃微生物代谢后的产物是主要的雌激素活性物质[1]。Shackell G. H. 等人认为，当红三叶草中芒柄花素含量达到0.68%时，就会对放牧的成年母羊的繁殖率产生显著影响[2]。而苏联Малоян О. О. 等人却认为适当浓度的芒柄花素不但无有害作用，反而可以提高反刍家畜的产肉和产奶性能[3]。我们曾经利用薄层扫描法建立了三叶草中芒柄花素含量的测定方法[4]。为了提高测定的灵敏度和精确度，更重要的是为了研究牧草中芒柄花素在饲草动物体内的生理、生化作用，首次研究建立了芒柄花素的放射免疫测定法。这方面工作，国内外迄今未见报道。

材 料 和 方 法

1.抗原和同位素示踪物的合成以及免疫程序（图1）

（1）抗原的制备

芒柄花素属于半抗原，在碱性条件下芒柄花素的7位酚羟基可和氯乙酸钠反应[5]，得到芒柄花素-7-羧甲基醚（FC），通过混合酸酐法[5]，将其和牛血清白蛋白（BSA，上海东风试剂厂）共价连接，重复透析过夜，冷冻干燥，得到BSA-F。用UVIKON 810/82型紫外分光光度计测定结合比，大约每个BSA分子上结合15个芒柄花素分子（图2）。

（2）免疫程序

用BSA-F免疫4只雄性青紫兰兔（平均体重4 kg/只）。基础免疫每兔1 mg，配成Freund's完全佐剂，作家兔背部多点法皮内注射。半个月后加强免疫（不完全佐剂，剂量减半）。以后每隔1个月加强一次。免疫五次后，4只兔都产生抗体，免疫7次后，两只兔效价达到1万，其中1号兔的亲和常数达到6.8×10^9 L/M。颈静脉收集1号兔的全血，血清分离后，按1：1000加NaN_3，分装保存于-15°C冰箱。

（3）同位素示综物的合成

通过混合酸酐法，使合成的FC和（4，5-^{3}H)-亮氨酸（105 Ci/mmol，上海原子核研究所）形成酰胺键，得到^{3}H-芒柄花素衍生物（FD）。反应混合物在甲醇：氯仿=11：89溶剂系统中行薄层层析（Kieselgel 60G（Merck）溶于0.3% CMC-Na制板，板厚0.2 mm，下同）。层析后，经岛津CS-930型薄层扫描仪扫描（λ_R 270nm），然后每隔5 mm刮下，无水乙醇分别萃取，用Beckman LS 9800型液闪测定仪测定各点的放射性强度。两项测定结果见图3。^{3}H-亮氨酸的利用率为22%。

2.放射免疫测定法

（1）标准曲线的制作

标准管中各加入FD 10000 cpm，再加入不同量标准芒柄花素，真空干燥器干燥后，加入0.2 ml、1：10000稀释的抗血清，摇匀后4°C、48小时。采用葡萄糖T-70加膜活性炭分离，其具体步骤参见文献[6]。所制作的标准曲线见图4。

（2）精密度和准确性

H_3CO

O

O　OH

formononetin

Cl-CH_2COON_a

Sodium chloroacetate

BSA -NH_2

H_3CO

O

O

O

CH_2COOH

F-7-O-(carboxymethyl) ether

COOH

H_2NCHCH_2CH CH_3^* CH_3^*

leucine

mixed anhydride reaction

mixed anhydride reaction

H_3CO

O

O

O

CH_2

C=O

NH

BSA

H_3CO

O

O

O

CH_2

C

NH

HOOC—$CHCH_2CH$ CH_3^* CH_3^*

(^3H)formononetin derivative

图1　免疫原（BSA-F）和同位素示踪物（FD）的合成示意图

Fig. 1 Synthetic scheme and structure of the formononetin-7-O-(carboxymethyl) ether-BSA conjugate used for immunization and the (^3H) formononetin derivative used as a tracer. The asterisks denote possible sites of ^3H (see Materials and Methods).

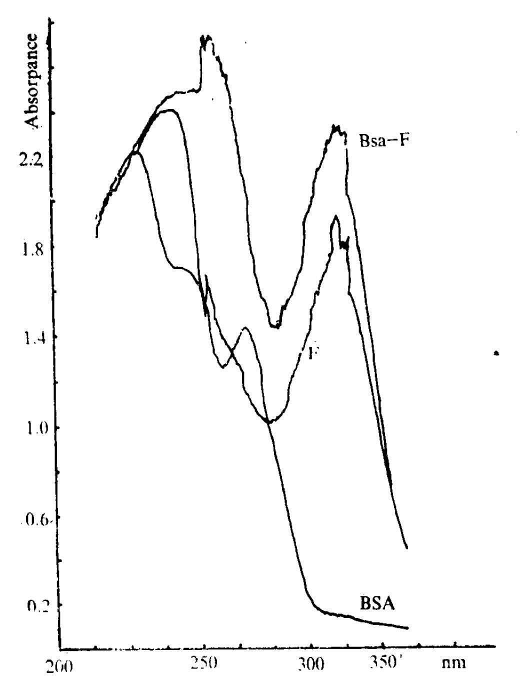


图 2 BSA、F和BSA-F的紫外吸收曲线

Fig. 2 UV spectra of BSA, F & BSA-F

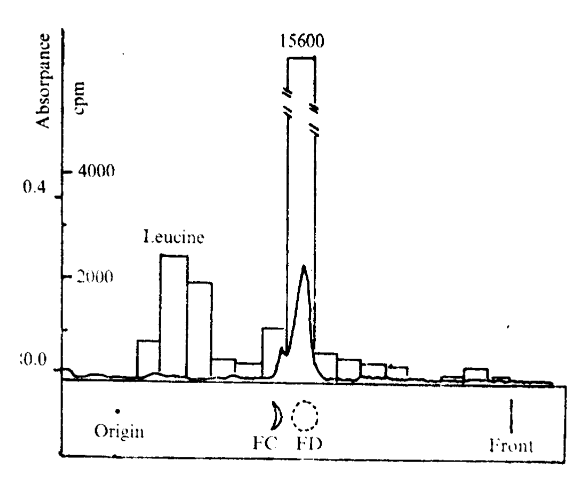


图 3 FC、FD和^{3}H-亮氨酸的薄层层析图

Fig. 3 Distribution of FC, FD and (^{3}H)-materials on a thin-layer chromatogram.
FC: F-7-O-(carboxymethyl)ether;
FD: (^{3}H) formononetin derivative.

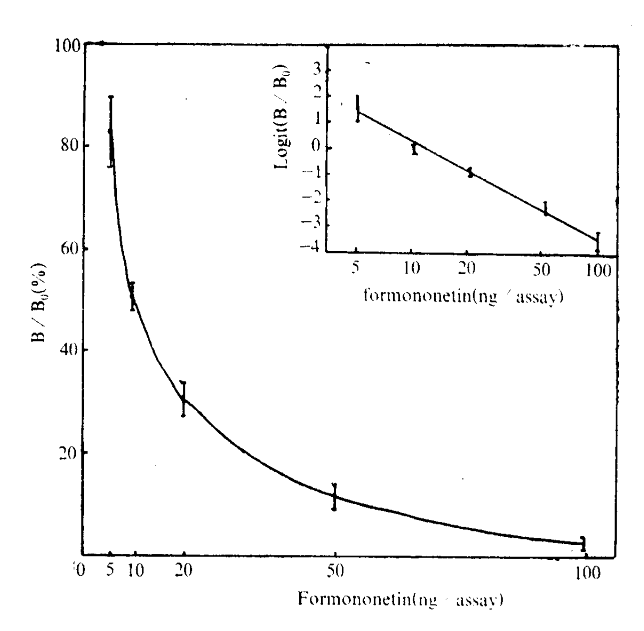


图 4 芒柄花素放射免疫测定法标准曲线

Fig. 4 Typical standard curve for formononetin radioimmunoasssy using the (^{3}H) formononetin derivative as the tracer. The bars indicate standard deviation for triplicate samples. The insert shows the linear transformation of the standard curve using the logit plot. (r = -0.993)

用2SD方法算出灵敏度为3.5±1.24 ng（n＝13），测定范围为3.5—100 ng。

用红三叶草（*Trifoliun pratense* L.）作为实验材料，用乙醇进行迴流提取，其具体提取方法可参见文献[4]。

用两份红三叶草的乙醇抽提液作为样品，测定该方法的批内、批间误差，结果见表1。

向已知芒柄花素浓度的红三叶草抽提液中加入不同浓度的标准芒柄花素，测定加样回收率，其结果见表2。

表1 芒柄花素RIA的批内和批间误差

Table 1 Variability of intra/inter assay

	Sample (n)	Measured (ng)	CV (%)	$\overline{CV}$ (%)
Intra－	Ⅰ(n＝7)	36.3＋2.43	6.7	6.5
	Ⅱ(n＝6)	42.8＋2.75	6.4	
Inter－	Ⅰ(n＝6)	49.6＋3.97	10.6	11.9
	Ⅱ(n＝5)	49.1＋6.42	13.1	

表2 红三叶抽提液中的加样回收率测定

Table 2 Recovery of assay in extracted red clover

Added (ng)	Measured (ng)	Calculated (ng)	Recovery (%)
0	5.5		
5	11.5	10.5	109.5
45	45.5	50.5	90.1
45	48.5	50.5	96.0
$\overline{X}$			98.5

（3）特异性

用三种黄酮化合物（图5），对该抗血清作了交叉反应，结果见表3。其中

图5 检测抗血清特异性的黄酮化合物结构

Fig. 5 Sturctures of the flavonoids used to test for specificity of the antiserum.

Q3#系美国人工合成物，由上海第二军医大学韩公羽教授赠。

表3 交叉反应率测定

Table 3 Cross-reactivity of various flavonoids structurally related to formononetin

Compound	ng needed for 50% displacement of the tracer	% cross-reactivity
formononetin	10	100
Q3*	255	3.9
quercetin	46500	<0.1
matheucinol	46000	<0.1

该抗血清特异性的另一个试验是进行了红三叶草抽提液的免疫直方图（Immuno-histogram），结果见图6。

3.该方法的应用

（1）牧草中芒柄花素浓度的测定

于1989年7—8月份取红三叶草栽培品（江苏省农科院杨运生研究员赠），经提取后[4]，用该方法测得芒柄花素百分浓度为0.1305±0.495%（n=12）。

同时，测定了南京地区夏季杂牧草中的芒柄花素百分含量，结果为0.0062±0.030%（n=6）。

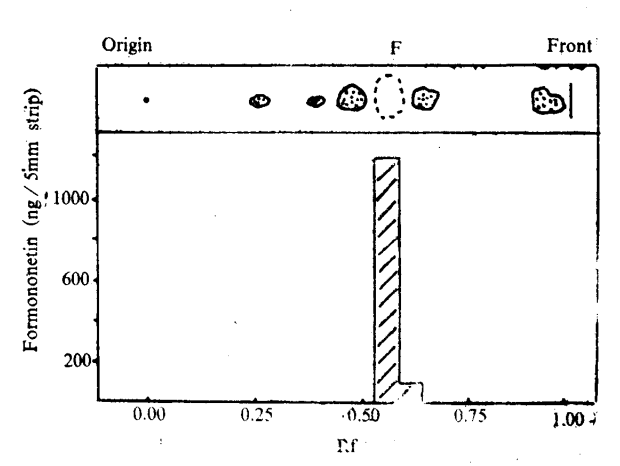


图6 红三叶抽提液中免疫活性物质的薄层层析图

Fig. 6 Distribution of Immunoreactive material on a thin-layer chromatogram of the extract of red clover.

⊛: coloured spots on TLC;

◌: blue fluorescent spot under the wavelength of 254 nm.

（2）湖羊中芒柄花素的血浓-时间曲线

以杂牧草为对照，测定两头健康阉公湖羊一次性添喂红三叶草（占全天饲草量的1/4）后，血清中芒柄花素的血浓-时间曲线。由图7可知，对照期湖羊血清中未能检测到芒柄花素，而试验期在添喂红三叶草4小时后出现高峰。

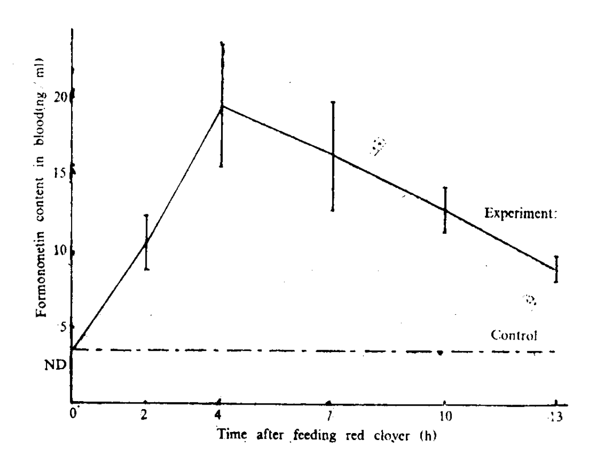


图 7 湖羊血清中芒柄花素的血浓—时间曲线

Fig. 7 Formononetin content in the blood of Hu sheep on a ration of red clover and complex herbages (Hu sheep fed with red clover at zero time).

讨　论

1.天然豆科牧草中存在芒柄花素和芒柄花素-7-O-糖甙两种形式，本试验方法是在酸性条件下提取[4]，从而测定的量包括其甙中的甙元。

2.在制备同位素示踪物时，使FC与^{3}H-亮氨酸的结合部位同FC与BSA 的结合部位一致，这样可减少抗血清对该示踪物和芒柄花素两者选择性的差异。结果亦证明了这一点。

致谢 上海第二军医大学植化教研室韩公羽教授和本教研室陈伟华同志给予指导、帮助，并审阅全文。

参 考 文 献

1 Van Soest. Nutritional Ecology of the Ruminant. New York: Cornell University Press, 1982; 135

2 Shackell G H et al. *New Zealand J of Experi Agric* 1984; 12: 113

3 Мапоян О О, Милованов В К. Животноводство 1972; 12: 82

4 王伟群，韩正康. 草业科学 1989; 6（1）：20—22

5 李振甲，王仁芝等. 激素的放射免疫分析. 北京：科学技术文献出版社，1985: 33, 396

6 丁霆等. 竞争放射分析. 北京：原子能出版社，1981: 164—171